



Docket No. 242292US0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Toshiteru KOMATSU, et al.

GAU: 1651

SERIAL NO: 10/654,890

EXAMINER: SINGH, SATYENDRA K

FILED: September 5, 2003

FOR: REGENERATING METHOD OF IMMOBILIZED ENZYME

SUBMISSION NOTICE REGARDING PRIORITY DOCUMENT(S)

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

Certified copies of the Convention Application(s) corresponding to the above-captioned matter:

☒ are submitted herewith

☐ were filed in prior application filed

☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number _____
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon


Richard L. Chinn, Ph.D.

Registration No. 34,305

Joseph Scafetta, Jr.
Registration No. 26,803

Customer Number
22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 11/04)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 9 月 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 6 1 2 5 6
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

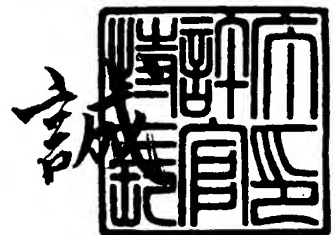
J P 2 0 0 2 - 2 6 1 2 5 6

願 人 花王株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 0 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

中 嶋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 8 4 3 9 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 P04111409

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 11/08

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県鹿島郡神栖町東深芝 2 0 花王株式会社研究所内

 【氏名】 小松 利照

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県鹿島郡神栖町東深芝 2 0 花王株式会社研究所内

 【氏名】 宇治田 吾朗

【特許出願人】

 【識別番号】 000000918

 【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000084

 【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

 【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 164232

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固定化酵素の再生方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 油脂の加水分解反応に使用し活性が低下した油脂分解用固定化酵素に溶剤を添加して洗浄し、当該洗浄液中の脂肪酸平衡濃度を 5 ～ 25 重量 % に調整した後、洗浄液を除去し、油脂加水分解酵素を吸着させる油脂加水分解用固定化酵素の再生方法。

【請求項 2】 溶剤が、エタノール又は n-ヘキサンである請求項 1 記載の再生方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、油脂加水分解反応における使用済み固定化酵素の残存活性を有効利用し、安価に、かつ少ない廃液量で、使用前と同等の性能を有する油脂加水分解用固定化酵素に再生する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

油脂を油脂分解酵素を用いて加水分解する際に、酵素を効率的に使用するため、無機又は有機の担体に油脂分解酵素を固定化した固定化酵素が用いられている。この固定化酵素は、長期間にわたり加水分解反応に使用されるにつれて、その活性が低下するため、ある程度活性が低下した時点で回収し、新たな固定化酵素と交換する必要がある。

【 0 0 0 3 】

回収された使用済み固定化酵素を有効利用する手段としては、これに付着している油分及び蛋白質をすべて除去し、担体として再利用する方法が容易に考えられる。しかし、この方法は、酵素担体の数百倍という多量の洗浄廃液を発生し環境上の問題があると共に、使用済み固定化酵素に残存する活性を利用できないという問題もある。

【 0 0 0 4 】

また、エステル交換反応やエステル転移反応に使用した活性の低下した固定化リパーゼを、溶剤処理、又は溶剤とリン脂質を用いて湿潤処理して反応に寄与する水分をコントロールすることにより、残存するリパーゼを再活性化する方法がある（例えば、特許文献1～3参照）。しかし、これらはリパーゼの脱離により活性が低下した固定化酵素を再生するものではない。

【0005】

【特許文献1】

特開平5-137574号公報

【特許文献2】

特開平9-56379号公報

【特許文献3】

特開平11-75834号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明は、油脂加水分解反応における使用済み固定化酵素の残存活性を有効利用し、安価に、かつ少ない廃液量で、使用前と同等の性能を有する油脂加水分解用固定化酵素に再生する方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

ところで、油脂加水分解酵素を固定化するに際し、酵素担体に予め脂肪酸を吸着させることにより、高活性な固定化酵素が得られることが知られている（特開平1-153090号公報等）。本発明者は、油脂加水分解反応に使用された固定化酵素に付着している多量の脂肪酸を完全に除去することなく、上記活性化に有効な量が残存するように溶剤で処理した後、低下した活性分の酵素を吸着させることにより、使用済み固定化酵素を、環境上及び経済上有利に、新規な固定化酵素と同等の活性に再生することができることを見出した。

【0008】

すなわち本発明は、油脂の加水分解反応に使用し活性が低下した油脂分解用固定化酵素に溶剤を添加して洗浄し、当該洗浄液中の脂肪酸平衡濃度を5～25重量

%に調整した後、洗浄液を除去し、油脂加水分解酵素を吸着させる油脂加水分解用固定化酵素の再生方法を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

【発明の実施の形態】

本発明の再生方法の対象となる固定化酵素における固定化用担体としては、セライト、ケイソウ土、カオリナイト、シリカゲル、モレキュラーシーブス、多孔質ガラス、活性炭、炭酸カルシウム、セラミックス等の無機担体、セラミックスパウダー、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、キトサン、イオン交換樹脂、疎水吸着樹脂、キレート樹脂、合成吸着樹脂等の有機高分子等が挙げられるが、特にイオン交換樹脂が望ましい。

【 0 0 1 0 】

イオン交換樹脂としては、多孔質の陰イオン交換樹脂が好ましい。このような多孔質担体は、大きな表面積を有するため、酵素のより大きな吸着量を得ることができる。樹脂の粒子径は100～1000 μ mが好ましく、細孔径は10～150nmが好ましい。材質としては、フェノールホルムアルデヒド系、ポリスチレン系、アクリルアミド系、ジビニルベンゼン系等が挙げられ、特にフェノールホルムアルデヒド系樹脂（例えば、Rohm and Hass社製Duolite A-568）が望ましい。

【 0 0 1 1 】

本発明で使用する油脂分解酵素としては、リパーゼが好ましい。リパーゼは、動物由来、植物由来のものはもとより、微生物由来の市販リパーゼを使用することもできる。微生物由来リパーゼとしては、リゾプス（*Rizopus*）属、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、ムコール（*Mucor*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、ジオトリケム（*Geotrichum*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属、カンディダ（*Candida*）属等の起源のものが挙げられる。

【 0 0 1 2 】

本発明の再生方法の対象となる使用済み固定化酵素は、油脂の加水分解反応に使用され活性が低下したものである。この油脂としては、大豆油、オリーブ油、パーム油、ナタネ油等の植物油、牛脂、豚脂、魚油等の動物油が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

使用済み固定化酵素の洗浄に使用する溶剤としては、エタノール、n-ヘキサン、アセトン等が挙げられ、特にエタノール、n-ヘキサンが好ましい。また、残存酵素の脱離・失活が無く、酵素使用量を低減できる点ではn-ヘキサンがより好ましい。

【0014】

使用済み固定化酵素をこれらの溶剤で一定時間（30分程度）洗浄すると、溶剤中の脂肪酸濃度と固定化酵素の残存（吸着）脂肪酸量が平衡に達する。溶剤中の脂肪酸濃度は、例えば、溶液単位重量当たりの溶解脂肪酸重量で表される。また、固定化酵素に残存する脂肪酸量は、例えば、固定化酵素単位重量当たりの脂肪酸重量で表される。本発明においては、高活性な再生固定化酵素を得るために、この脂肪酸平衡濃度を5～25重量％に調整する必要がある。脂肪酸平衡濃度のより好ましい範囲は、10～22.5重量％、特に10～20重量％である。溶剤の使用量は、洗浄による脂肪酸平衡濃度が上記範囲となる量とすればよいが、一般的には、使用済み固定化酵素の3～10重量倍、特に5～8重量倍程度が好ましい。溶剤による固定化酵素の洗浄温度は、残存する酵素の失活が起きない0～60℃、特に5～40℃が好ましい。

【0015】

溶剤による洗浄後は、洗浄液を濾過等により除去した後、固定化酵素を緩衝液で洗浄する。この緩衝液による洗浄で残存する溶剤を完全に除去するが、このとき、蒸留により溶剤を除去してもよい。特に、溶剤がn-ヘキサンの場合には、蒸留を行うことが好ましい。この蒸留は、常圧蒸留でも減圧蒸留でもよい。緩衝液としては、続いて行われる酵素の固定化に使用されるものを使用するのがよい。

【0016】

酵素の固定化を行う温度は、酵素の特性によって決定することができるが、酵素の失活が起きない0～60℃、特に5～40℃が好ましい。また固定化時に使用する酵素溶液のpHは、酵素の変性が起きない範囲であればよく、温度同様酵素の特性によって決定することができるが、pH3～9が好ましい。このpHを維持するためには緩衝液を使用するが、緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等が挙げられる。

【0017】

上記酵素溶液中の酵素濃度は、固定化効率の点から酵素の飽和溶解度以下で、かつ十分な濃度であることが望ましい。また吸着させる酵素量は、使用済み固定化酵素の残存活性に応じて調整すればよい。酵素溶液としては、必要に応じて不溶部を遠心分離で除去した上澄や、限外濾過等によって精製したものを使用することもできる。

【0018】

酵素の固定化後は、濾過により湿潤状態の固定化酵素を回収し、そのまま次の油脂加水分解反応に使用することもでき、また必要に応じて特開平12-166552号公報記載の油脂を用いて処理する方法や乾燥等により、水分を除去してもよい。

【0019】

なお、固定化酵素の活性（1 U）は、40℃において、油脂：水＝100重量部：25重量部の混合液を攪拌混合しながら30分間加水分解をさせたとき、1分間に1 μmol の遊離脂肪酸を生成する酵素の分解能を示す。

【0020】

【実施例】

使用済み固定化酵素の準備

Duolite A-568 (Rohm and Hass社) 10重量部をN/10の水酸化ナトリウム水溶液100重量部中で1時間攪拌した。濾過した後、100mlのイオン交換水で洗浄し、500mMのリン酸緩衝液（pH 7）100重量部でpHの平衡化を行った。その後、50mMのリン酸緩衝液（pH 7）100重量部で2時間ずつ2回、pHの平衡化を行った。この後濾過を行い、担体を回収した後、エタノール50重量部でエタノール置換を行った。濾過した後、リシノール酸10重量部とエタノール50重量部の混合液を加え、30分間リシノール酸を担体に吸着させた。その後、担体を回収し、50mMのリン酸緩衝液（pH 7）50重量部で30分ずつ4回洗浄してエタノールを除去し、濾過して担体を回収した。その後、リパーゼ（リパーゼAYアマノ30，天野製薬社）3.88重量部を50mMリン酸緩衝液（pH 7）90重量部に溶解した酵素液と2時間接触させ、固定化を行った。この時、固定化後の酵素液の残存活性と固定化前の酵素液の活性の差より固定化率を求めたところ、70%であった。固定化後に濾過して固定化酵

素を回収した後、50mMのリン酸緩衝液（pH 7）50重量部で30分間洗浄を行い、固定化していない酵素や蛋白を除去した。洗浄後に濾過して湿潤状態の固定化酵素を回収した。次に回収した固定化酵素とナタネ油40重量部とを2時間接触させ、濾過して油処理した固定化酵素を回収した。以上の操作は全て20℃で行った。

以上の操作で調製した固定化酵素は初期の発現活性で2,800U/gであった。この固定化酵素をカラムに充填し、反応基質（ナタネ油：水＝100重量部：60重量部）を混合させながらカラムに循環して行う加水分解操作を連続的に繰り返した。酵素の発現活性は反応操作の繰り返しに伴い低下し、種々の残存活性を有する使用済み固定化酵素（活性低下酵素）を回収した。

【0 0 2 1】

実施例 1

残存活性770U/gの使用済み固定化酵素10重量部（乾燥基準）に対しエタノール36重量部を加えて分散させ、30分間攪拌した。この時、攪拌操作後の洗浄液中の脂肪酸濃度は12.9重量％であった。濾過した後、50mMのリン酸緩衝液（pH 7）50重量部で30分ずつ4回洗浄し、エタノールを除去し、濾過して担体を回収した。その後、リパーゼ（リパーゼAYアマノ30，天野製薬社）3.88重量部を50mMリン酸緩衝液（pH 7）90重量部に溶解した酵素液と2時間接触させ、固定化を行った。この時、固定化後の酵素液の残存活性と固定化前の酵素液の活性の差より固定化率を求めたところ、67％であった。固定化後に濾過して固定化酵素を回収した後、50mMのリン酸緩衝液（pH 7）50重量部で30分間洗浄を行い、固定化していない酵素や蛋白を除去した。洗浄後に濾過して湿潤状態の固定化酵素を回収した。以上の操作は全て20℃で行った。

以上の操作で再生した固定化酵素は初期の発現活性で2,600U/gであった。

【0 0 2 2】

実施例 2

用いたエタノールが40重量部である以外は実施例 1 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は22.3重量％、酵素の固定化率は73.1％、発現活性は2,401U/gであった。

【0 0 2 3】

実施例 3

使用済み固定化酵素の残存活性が800U/gであり、用いたエタノールが40重量部である以外は実施例 1 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は19.7重量%、酵素の固定化率は70.9%、発現活性は2,910U/gであった。

【 0 0 2 4 】

実施例 4

使用済み固定化酵素の残存活性が1,440U/gであり、用いたエタノールが44重量部である以外は実施例 1 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は13.1重量%、酵素の固定化率は69.6%、発現活性は3,014U/gであった。

【 0 0 2 5 】

実施例 5

エタノールに代えてn-ヘキサンを用い、実施例 1 と同様に使用済み固定化酵素を分散させ、攪拌操作を30分行った。この時、攪拌操作後の溶媒中の脂肪酸濃度は12.8重量%であった。濾過した後、50mMのリン酸緩衝液 (pH 7) 50重量部を投入し、20℃、30Torrの減圧下で30分攪拌し、溶剤を除去した。濾過後、50mMのリン酸緩衝液 (pH 7) を50重量部で30分ずつ3回洗浄し、濾過して担体を回収した。その後のリパーゼ吸着は実施例 1 と同様に行った。酵素の固定化率は70%、再生後の発現活性は2,672U/gであった。

【 0 0 2 6 】

実施例 6

用いたn-ヘキサンが66重量部である以外は実施例 5 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は8.9重量%、酵素の固定化率は81.4%、発現活性は2,489U/gであった。

【 0 0 2 7 】

実施例 7

使用済み固定化酵素の残存活性が1,440U/gであり、用いたn-ヘキサンが44重量部である以外は実施例 5 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は13.7重量%、酵素の固定化率は67.5%、発現活性は2,768U/gであった。

【 0 0 2 8 】

比較例 1

使用済み固定化酵素の残存活性が700U/gであり、用いたエタノールが120重量部である以外は実施例 1 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は2重量%、酵素の固定化率は81.8%、発現活性は1,744U/gであった。

【0029】

比較例 2

用いたn-ヘキサンが33重量部である以外は実施例 5 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は30.4重量%、酵素の固定化率は59.8%、発現活性は2,167U/gであった。

【0030】

比較例 3

用いたn-ヘキサンが99重量部である以外は実施例 5 と同様に行った。洗浄液中の脂肪酸濃度は3.1重量%、酵素の固定化率は83.8%、発現活性は2,200U/gであった。

【0031】

各実施例及び比較例における使用済み固定化酵素の洗浄液中の脂肪酸濃度と、得られた再生固定化酵素の発現活性との関係を、図1に示す。

【0032】

【発明の効果】

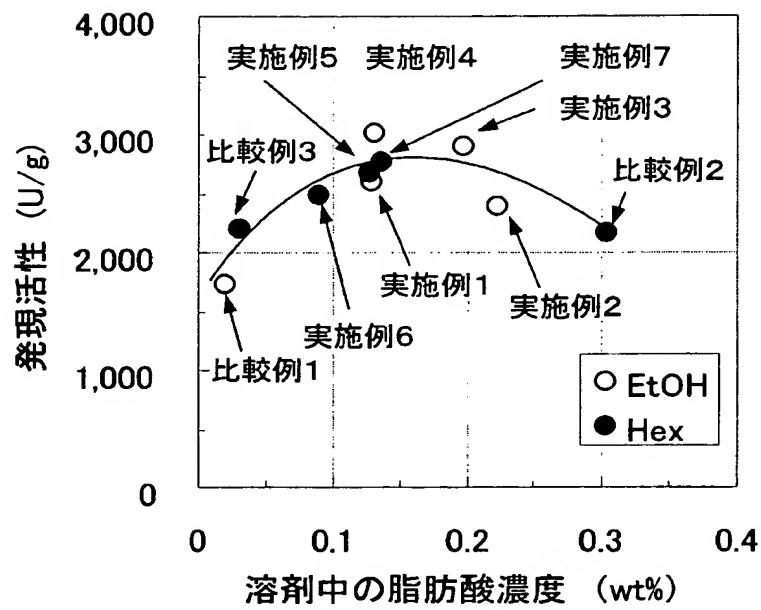
本発明によれば、油脂加水分解反応における使用済み固定化酵素の残存活性を有効利用して、安価に、かつ少ない廃液量で、使用前と同等の性能を有する油脂加水分解用固定化酵素に再生することができる。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

各実施例及び比較例における使用済み固定化酵素の洗浄液中の脂肪酸濃度と、得られた再生固定化酵素の発現活性との関係を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 油脂加水分解反応における使用済み固定化酵素の残存活性を有効利用し、安価に、かつ少ない廃液量で、使用前と同等の性能を有する油脂加水分解用固定化酵素に再生する方法の提供。

【解決手段】 油脂の加水分解反応に使用し活性が低下した油脂分解用固定化酵素に溶剤を添加して洗浄し、当該洗浄液中の脂肪酸平衡濃度を 5 ～ 25 重量％に調整した後、洗浄液を除去し、油脂加水分解酵素を吸着させる油脂加水分解用固定化酵素の再生方法。

【選択図】 なし

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 6 1 2 5 6
受付番号	5 0 2 0 1 3 3 7 4 6 9
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 9 月 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年 9月 6日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 6 1 2 5 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名 花王株式会社